

# Különlenyomat az Orvosi Hetilap 1933. évi márc. 11-i, 10. számából.

---

A Ferenc József Tud.-Egyetem belgyógyászati klinikájának közleménye (igazgató: Rusznyák István ny. r. tanár).

## A húgysav új térfogatos mikro- meghatározása vizeletben és vérben.

Irták: *Rusnyák István dr. és Hatz Ella dr.*

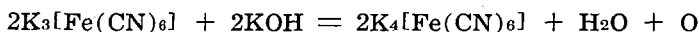
A klinikai gyakorlatban régóta ismereteseek gravimetriás, titrimetriás és kolorimetriás húgysav meghatározási módszerek. Míg a régibb eljárások nagyobb anyagmennyiségekkel dolgoztak, addig az újabb módszerek — mikromeghatározások megteremtésével — sikerrel oldották meg a vér húgysavtartalmának meghatározását is. Ezek a titrimetriás és kolorimetriás mikromeghatározások, amelyek közül pontosság tekintetében a kolorimetriás módszerek válnak ki, a klinikai gyakorlatban csakhamar elterjedtek. Az a tapasztalatunk azonban, hogy a kolorimetriás megfigyelések általában nehezen mentesíthetők subjectiv eredetű hibáktól, arra késztetett bennünket, hogy *kolorimetriás mérésnek alávetett oldat színes componensének concentratióját titrimetrikus úton határozzuk meg.* Sikerült egy olyan térfogatos módszert találnunk, amelyben a fentemlített színes componens elszíntelenedik, tehát a színváltozás olyan karakterű, mint a jodometriában. E módszer pontosság tekintetében a kolorimetriás módszerekkel egyenrangú; segítségével a húgysav 0.01 mg pontossáig a legnagyobb biztonsággal meghatározható.

Mint ismeretes<sup>1)</sup> a húgysav kolorimetriás meghatározása a húgysavnak azon tulajdonságán alapszik, hogy a phosphorwolframsav oldatból — reductiv behatás révén — intensív kék színű reductiós terméket létesít. E kék színű vegyület chemiai szerkezetére vonatkozólag az irodalomban adatot nem találunk. Minden valószínűség szerint analog a phosphor-molybdensavból bizonyos organikus anyagok hatására képződő  $\text{Mo}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{MoO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  összetételű vegyülettel,<sup>2)</sup> tehát összetétele  $\text{W}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{WO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  formulával fejezhető ki. Mindenesetre kétségtelen

az, hogy e kék színű vegyület a wolfram egy alacsonyabb oxydja, mely oxydatív behatással a szintelen magasabb oxyddá ( $\text{WO}_3$ ) alakítható vissza. Vizes oldatokban természetesen megfelelő hidrat formulákról, vagyis wolfram savakról van szó. Az oxydatiós folyamat reactio schemája a következőképen adható meg:



Eljárásunkban ezt az oxydatiót  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  oldattal végeztük. A  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  lúgos közegben  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -á történő átalakulás közben 1 aequivalens oxygent ad le:



Ebből következik, hogy 1 mol.  $\text{W}_2\text{O}_5.3\text{WO}_3$  aequivalens 2 mol.  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -al. Ha tudnánk azt, hogy egy mol húgysav, hány mol  $\text{W}_2\text{O}_5.3\text{WO}_3$ -t létesít, akkor a fent-vázolt reactio-egyenletek alapján az 1 mol húgysavval aequivalens  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  mennyiségét minden nehézség nélkül kiszámíthatnánk. Minthogy azonban említett adat nem áll rendelkezésünkre (a húgysav és phosphorwolfram között lejátszódó reactio mechanismusa ugyanis eddig még felderítetlen) a számítás alapját képező factor értéke csakis úgy számítható ki, ha tiszta húgysav-oldatokkal készült analysisek adataira támaszkodunk. E számításmód nem jelenti azt, hogy itt pusztán úgynevezett empirikus factor megállapításáról van szó, mert mint látni fogjuk, a reductióban elhasznált húgysav és az oxydatiót végző  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  mennyisége között szigorú stoechiometrikus arány áll fenn. Az előbb monditakat a factor kiszámításának most ismertetendő módja még jobban megvilágítja. Tegyük fel, hogy egy mol húgysav egy mol  $\text{W}_2\text{O}_5.3\text{WO}_3$ -t létesít. Ez esetben 168.04 gr (azaz 1 gr mol) húgysav 2 liter mol/1  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  oldattal lenne aequivalens, 1 ccm mol/100  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  oldat tehát 0.8402 mg húgysavnak felelne meg. Tiszta húgysavoldatokkal különböző concentratióban végzett meghatározások azonban ahhoz az eredményhez vezettek, hogy a fenti egyenértékszám alkalmazása esetén a talált húgysavmennyiségek a bemért húgysavmennyiségeknek pontosan a háromszorosát teszik ki. E kísérleti tényből nyilvánvalóan következik, hogy a helyes egyenértékszám a fenti feltételeken elfogadott egyenértékszámnak a harmadrésze, azaz 0.2800. Közelfekvő gondolat ezekből a kísérleti eredményekből a húgysav és phosphorwolfram-

sav között lejátszódó reactio componensei között fennálló stoichiometrikus viszonyra következtetni. Erre a kérdésre kétséget kizáró bizonyossággal csakis akkor felelhetünk, ha a reduktíós termék szerkezetéül a  $W_2O_5 \cdot 3WO_3$  formulával kifejezésre juttatott szerkezetet fogadjuk el. Ez esetben nyilvánvaló, hogy egy mol húgysav három mol  $W_2O_5 \cdot 3WO_3$ -at létesít.

Fenti reakciók ismeretének birtokában módszerünk lényege a következőképen foglalható össze: A vizeletből és vérből a húgysav megfelelő leválasztás útján, illetőleg megfelelő fehérjementesítés után nyert húgysav oldathoz  $Na(CN)$  és  $Na_2CO_3$  jelenlétében phosphorwolframsav-oldatot adunk. Az eljárás első része tehát követi a *Folin* és *Wu*, *Folin* és *Benedict*<sup>3)</sup> stb. által kidolgozott kolorimetriás eljárás előkészítő folyamatát. A reduktió terméktől kékre színeződött oldatot lúg hozzáadása után mol/100, illetőleg mol/200  $K_3[Fe(CN)_6]$  oldattal elszíntelenedésig titrálunk.

#### Kísérleti rész.

##### Szükséges reagenssek.

1. *Ezüstlactat reagens*<sup>4)</sup> 25 g ezüstlactátot 25 ccm tejsavat és 25 ccm 10%-os  $NaOH$ -oldatot 450 ccm vízben oldunk.

2. *Natriumcyanid oldat*<sup>5)</sup> 50 g  $NaCN$ -t 700 ccm vízben oldunk, majd 300 g carbamid hozzáadása után az oldatot 4—5 percig 5 g  $CaO$ -dal rázzuk. Az oldat szűrése után dinatriumhydrophosphattal leválasztjuk a fölös  $CaOH$ -t, majd az oldatot újra szűrjük.

3. 20%-os  $Na_2CO_3$ -oldat (2 hetenként frissen készítenendő).

4. *Natriumphosphorwolframat oldat*<sup>6)</sup> 100 g natriumwolframatot 200 ccm vízben oldunk és az oldathoz hűtés és rázogatózás közben 20 ccm 85%-s phosphorsavat adunk. Az oldatba 20 percig lassú áramban  $H_2S$ -t vezetünk, majd újra 10 ccm phosphorsavat viszünk be. A csapadékos oldatot szűrjük, az első 40 ccm-nyi szüredéket újra visszaöntjük a szűrőbe. A tiszta szüredékhez 300 ccm alkoholt adunk, ezzel választó tölcserben alaposan összerázzuk, majd rövid ideig tartó állás után az alsó folyadékréteget 500-as lombikba bocsátjuk le s térfogatát vízzel 300 ccm-re egészítjük ki. Az oldatot a  $H_2S$  elűzése céljából rövid ideig forraljuk (kémlés a gőztérben ólomacetátos papírral), újra 20 ccm phosphorsavat viszünk be, majd

visszafolyóhűtőn egy óráig enyhén forraljuk. Az így nyert zöldszínű oldatot pár csepp brómmal elszíntelenítjük és a brom feleslegét újrafüréssel elűzzük. 12 g lithiumcarbonatot 150 ccm vízbe viszünk és az elegyhez 20 ccm phosphorsavat adunk. A  $\text{CO}_2$  kifőzése után a képződött lithiumposphat oldatot lehűtjük, majd az előbb nyert phosphorwolframsav oldathoz adjuk. Az oldatot 1 literre egészítjük ki.

5. 10%-os  $\text{NaOH}$  oldat.

6.  $\text{mol}/100$  és  $\text{mol}/200$   $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  oldat. 3.292, illetőleg 1.646 g pro anal.  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -t 1 l-es mérőlombikban vízben oldunk és a lombikot pontosan a jelig töltjük fel. Amennyiben megbízható tisztaságú praeparatum nem áll rendelkezésünkre, célszerű a következő módon eljárni: 16.46 g  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -t vízben pontosan 500 ccm-re oldunk (mérőlombik). Ez az oldat  $\text{mol}/10$ -os oldatnak felel meg, melyből pontos tíz-, illetőleg húszszoros hígítással (pipetta és mérőlombik)  $\text{mol}/100$ , illetőleg  $\text{mol}/200$  oldatot készítünk. Az oldat factorát a következőképen határozzuk meg:<sup>7)</sup> 20 ccm  $\text{mol}/100$  oldatot 100-as mérőlombikba viszünk,  $\text{KOH}$ -dal erősen meglúgosítjuk, felfőzzük, majd addig adunk hozzá frissen készült, tömény  $\text{FeSO}_4$ -oldatot, míg a csapadék megfeketedik. Lehűtés után a lombikot jelig töltjük fel. A csapadékos oldatot száraz-szűrőn át száraz pohárba szűrjük és a szűredék 50 ccm-ét kénsavval történő erős savanyítás után pontosan beállított  $n/10$   $\text{KMnO}_4$ -oldattal titráljuk. A fogyasztott  $\text{KMnO}_4$  ccm-ek száma osztva 10-zel adja a  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  factorát, vagyis e számmal a húgysav meghatározásakor elfogyasztott  $\text{mol}/100$   $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  oldat ccm-einek számát mindenkor meg kell szoroznunk.

A vér fehérjementesítéséhez szükséges oldatok.

7. 10%-os  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  oldat.

8.  $2/3$   $n$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  oldat. Készítése céljából 35 g conc. puriss.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -t vízzel 1000 ccm-re hígítunk.

**Meghatározás vizeletben.** 1 ccm vizeletet centrifugacsőbe viszünk és 3 ccm vízzel felhígítjuk, majd 6 ccm ezüslactat-oldatot (1) adunk hozzá. Pár percnyi sötétben történő állás után a csapadékos oldatot centrifugáljuk. Tanácsos centrifugálás után pár csepp ezüslactat-oldat hozzáadásával meggyőződni arról, hogy a húgysav egész mennyisége levált-e. Ha ilyenkor csapadék keletkeznék, úgy kevés ezüslactat hozzáadása után a centrifugálást megismételjük. Centrifugálás után az oldat tisztáját óva-

Anyag	$K_3 [Fe (CN)_6]$ ccm.	I. Talált húgysav mg.
1 ccm vizelet	2.44 m/100	0.684
1 ccm vizelet	2.46 „	0.588
1 ccm vizelet	2.33 „	0.652
1.25 ccm vér*)	0.625 m/200	0.0875
1.25 ccm vér*)	0.33 „	0.0462
1.25 ccm vér*)	0.56 „	0.0784

## II. táblázat.

Parallel próbába bevitt húgysav mg.	K <sub>3</sub> [Fe (CN) <sub>6</sub> ] ccm.	II. Talált húgysav mg.	Számított húgysav mg	Eltérés mg.
0.200	3.12 m/100	0.874	0.884	— 0.010
0.200	3.20 „	0.890	0.888	+ 0.002
0.200	3.04 „	0.851	0.852	— 0.001
0.025	0.80 m/200	0.1120	0.1125	— 0.0005
0.025	0.53 „	0.0742	0.0712	+ 0.003
0.025	0.92 „	0.1288	0.1284	+ 0.0004



tosan leszivornyázzuk és a csapadékot  $7\frac{1}{2}$  ccm NaCN-oldatban (2) üvegbottal történő keverés közben oldjuk. A centrifugacső szélét kívülről vékonyan bezsírozzuk és tartalmát 100-as mérőlombikba öntjük. Ezután a centrifugacsövet  $2 \times 5$  ccm 20%-os  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oldattal (3), majd 5 ccm destillált vízzel kiöblítjük és még 3 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -t adunk a mérőlombikba. A  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  mennyisége pontosan betartandó, mert a keletkező reduktív termék mennyisége a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  mennyiségével bizonyos összefüggésben van. Végül 5 ccm phosphorwolframsav-oldatot (4) viszünk a mérőlombikba és az oldatot 20 percig állni hagyjuk. Állás után a lombikot jelig töltjük, összerázzuk, az oldatból 50 ccm-t kipipettázunk és 15 ccm 10%-os NaOH-t (5) adunk hozzá. A lúg hozzáadása után azonnal titrálunk mol/100  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -al.

*Meghatározás vérben.* A húgysav meghatározására szolgáló vérszűredék nyerésére a *Folin*<sup>8)</sup> által megadott módszert használtuk. Az eljárás lényege abban áll, hogy alvadésgátlóul lithiumoxalátot használunk, melynek előállítására számított mennyiségű lithiumcarbonátot és oxalsavat hozunk össze és az oldatot bepároljuk. Az így nyert lithiumoxalátból 50-es lombikba kb. 6 mg-t mérünk és venából kb. 6 ccm vért engedünk rá. A lombik tartalmát alaposan összerázzuk és belőle 5 ccm vért 100 ccm-es lombikba pipettázunk. A vért 35 ccm vízzel haemolyzáljuk, 5 ccm 10%-os natriumwolframatot adunk hozzá és egy bürettából 5 ccm  $\frac{2}{3}$  n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -t csepegtetünk bele, miközben a folyadékot erősen rázzuk. A lombikot 5 pernyi állás után vízzel jelig feltöltjük, majd az oldatot száraz szűrőn át száraz edénybe szűrjük. A tiszta folyadékból 50 ccm-t 100 ccm-es száraz mérőlombikba pipettázunk,  $7\frac{1}{2}$  ccm NaCN-oldatot (2), 15 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3) és 5 ccm natriumwolframatot (4) adunk hozzá. 20 pernyi állás után a lombikot vízzel jelig töltjük, 50 ccm-t kipipettázunk belőle és 15 ccm 10%-os NaOH-al meglúgosítjuk és azonnal titráljuk mol/200  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -al.

A számítás menete. a) *Vizelet esetén* a következő formula szerint számítunk:

$$\text{húgysav mg/100 ccm vizelet} = 200 \text{ a. f. } 0.28,$$

hol „a” egyenlő a fogyasztott mol/100  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ccm-einek száma, — „f” egyenlő a  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  factorával.

b) *Vér esetén* a következő formula adja meg a számítás alapját:



húgysav mg/100 ccm vér = 80 a. f. 0.14,

hol a betűk jelentése ugyanaz, mint az előbbi esetben, az-  
zal a különbséggel, hogy „a” most mol/200  $K_3[Fe(CN)_6]$   
oldat ccm-einek számát jelenti.

Eljárásunkat mindenekelőtt pro anal. húgysavból  
készült pontos törzsoldatokkal próbáltuk ki. A húgysav  
tisztítását magunk végeztük és pedig oly módon, hogy  
egy *Merck*-féle praeparatumot híg NaOH-ban oldva pu-  
rissá híg HCl-el csaptunk ki; az eljárás megismétlése után  
nyert húgysavat *Büchner* tölcséren sósavmentessé mos-  
tuk, majd vízből átkristályosítottuk. Vízrel és alkohollal  
történő mosás után a nyert terméket  $CaCl_2$  felett va-  
cuumban kiszárítottuk.

A törzsoldatokon végzett meghatározásokon kívül kü-  
lönféle vér és vizeletpróbáknak is meghatároztuk a húgy-  
savtartalmát. Az ismert húgysav-tartalmú vérhez, vagy  
vizelethez meghatározott mennyiségű húgysavat mértünk  
és a meghatározást újból elvégeztük. Célszerű arra töre-  
kedni, hogy a meghatározásnak alávetett oldat húgysav-  
tartalma olyan határok között legyen, mint a kolorimetriás  
eljárásokban szokott, azaz 0.1—2 mg-ig.

I. táblázat.

Bemért 0.01 %-os húgy- savoldat ccm.	$K_3[Fe(CN)_6]$ oldat ccm.	Talált húgy- sav mg.	Számított húgysav mg.	Eltérés mg.
4	1.44 m/100	0.403	0.400	+ 0.003
8	2.86 „	0.801	0.800	+ 0.001
5	1.80 „	0.504	0.500	+ 0.004
5	1.78 „	0.500	0.500	0.000
10	3.60 „	1.008	1.000	+ 0.008
10	3.53 „	0.990	1.000	— 0.010
10	3.63 „	1.017	1.000	+ 0.017
15	5.29 „	1.480	1.500	— 0.020
15	5.40 „	1.512	1.500	+ 0.003
1	0.71 m/200	0.099	0.100	— 0.001
1	0.72 „	0.100	0.100	0.000
2	1.44 „	0.201	0.200	+ 0.001
2	1.46 „	0.204	0.200	+ 0.004

2	1.40	„	0.196	0.200	— 0.004
3	2.20	„	0.308	0.300	+ 0.008
3	2.10	„	0.294	0.300	— 0.006
3	2.18	„	0.305	0.300	+ 0.005
4	2.92	„	0.408	0.400	+ 0.008
4	2.98	„	0.417	0.400	+ 0.017

Mint a fenti táblázatokból látható, eljárásunkkal elérhető eredmények a számított értékkel igen jó megegyezést mutatnak és a húgysav mennyisége módszerünkkel 0.01 mg pontossáig meghatározható.

**Irodalom:** 1. *Folin és Wu:* Journ. of biol Chem. 1919. 38. 459.; *Folin:* Labor Manual of Biol. Chem. New-York 1925. 217. o. — 2. *F. Ephraim:* Anorg. Chemie, Dresden u. Leipzig 1929. 413. o. — 3. *H. Remy:* Lehrbuch der anorg. Chemie, Leipzig 1931. 2 k. 121. o. — 4. *Folin és Wu.* l. c. — 5—6. *Folin:* J. of. biol. Chem. 1930. 86. 179. — 7. *Treccani:* Analytische Chemie II. 450. —